

M2型巨噬细胞抑制放射后骨髓间充质干细胞向肌成纤维细胞转化的实验研究

赵路¹ 张哲儒¹ 贾骏麒² 宗春琳¹ 景莉¹ 郭凯¹ 田磊¹

¹军事口腔医学国家重点实验室,口腔疾病国家临床医学研究中心,陕西省口腔疾病临床医学研究中心,第四军医大学口腔医学院口腔颌面外科,西安 710032; ²解放军总医院第三医学中心口腔科,北京 100039

通信作者:田磊,Email:tianleison@163.com

【摘要】目的 研究M2型巨噬细胞对放射后的骨髓间充质干细胞(BMSC)向肌成纤维细胞转化的抑制作用。**方法** 分别培养SD大鼠来源的BMSC和由巨噬细胞极化而来的M2型巨噬细胞,通过免疫荧光鉴定其表面标志物。首先建立BMSC体外细胞辐照模型,然后依据本模型将放射后的BMSC整体单纯随机抽样分为3组,每组3个孔进行研究:实验组1(3 μm组),放射后的BMSC+M2型巨噬细胞Transwell小室(3 μm)共培养;实验组2(8 μm组),放射后的BMSC+M2型巨噬细胞Transwell小室(8 μm)共培养;对照组(NC组),BMSC单纯放射组。利用Western blot检测各组BMSC内α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)的含量,免疫荧光技术检测Ⅲ型胶原(ColⅢ)、活性氧(ROS)的表达水平。实验数据应用SPSS 22.0软件进行统计学分析。**结果** SD大鼠BMSC培养基中加入巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)30 ng/mL培养6~9 d后可获得成熟的巨噬细胞;应用20 ng/mL白细胞介素4(IL-4)24 h后可诱导成熟的巨噬细胞极化为M2型巨噬细胞;放射后的BMSC与M2型巨噬细胞用Transwell小室共培养48 h后,BMSC中α-SMA表达量明显降低,且8 μm组的Transwell小室的效果(0.225±0.018)要优于3 μm组的效果(0.564±0.026),差异具有统计学意义($t=18.71, P<0.001$)。通过8 μm Transwell小室将放射后的BMSC与M2型巨噬细胞共培养后,8 μm组BMSC中ColⅢ阳性百分比[(8.2±0.5)%]明显低于NC组[(60.7±1.5)%],差异有统计学意义($t=56.47, P<0.001$),且8 μm组中ROS阳性百分比[(9.3±1.7)%]较NC组[(25.9±1.6)%]亦显著降低,差异也有统计学意义($t=12.4, P=0.0002$)。**结论** M2型巨噬细胞可以减少放射后的BMSC中α-SMA、ColⅢ的表达并减少ROS的生成,抑制放射后的BMSC向肌成纤维细胞的转化,可能对放射性颌骨骨坏死具有一定的治疗作用。

【关键词】 骨髓细胞; 间质干细胞; 巨噬细胞; 肌动蛋白类; 胶原Ⅲ型; 活性氧

基金项目:国家自然科学基金(81670964)

引用著录格式:赵路,张哲儒,贾骏麒,等. M2型巨噬细胞抑制放射后骨髓间充质干细胞向肌成纤维细胞转化的实验研究[JOL]. 中华口腔医学研究杂志(电子版), 2021, 15(4): 198-206.

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2021.04.002

The experimental study of M2 macrophages inhibiting the transformation of bone marrow mesenchymal stem cells into myofibroblasts after radiation

Zhao Lu¹, Zhang Zheru¹, Jia Junqi², Zong Chunlin¹, Jing Li¹, Guo Kai¹, Tian Lei¹

¹State Key Laboratory of Military Stomatology & National Clinical Research Center for Oral Diseases & Shaanxi Clinical Research Center for Oral Diseases, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Stomatology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; ²Department of Stomatology, The Third Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100039, China

Corresponding author: Tian Lei, Email: tianleison@163.com

【Abstract】Objective To investigate the inhibitory effect of M2 macrophages on the transformation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) into myofibroblasts after radiation. **Methods** Bone marrow mesenchymal stem cells derived from SD rats and M2 macrophages polarized from macrophages were cultured separately, and their surface markers were identified by flow cytometry. Firstly, a model of

irradiated BMSCs *in vitro* was established. According to this model, the whole BMSC after radiation was randomly sampled and divided into three groups, with three holes in each group for research: group one (3 μm group), the irradiated BMSCs were co-cultured with M2 macrophages through the Transwell chamber (3 μm); group two (8 μm group), the irradiated BMSCs were co-cultured with M2 macrophages through the Transwell chamber (8 μm); group three (NC group), irradiated BMSCs. The content of α -smooth muscle actin (α -SMA) in BMSCs of each group was determined by western blot. Immunofluorescence technology was used to detect the expression levels of collagen type III (Col III) and reactive oxygen species (ROS). The data of this experiment were statistically analyzed using *t*-test and One-Way analysis of variance (SPSS 22.0). **Results** The mature macrophages can be obtained by adding macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) 30 ng/mL to the bone marrow mesenchymal stem cell culture medium of SD rats for 6-9 days; the mature macrophages were induced to become M2 macrophages by 20 ng/mL interleukin-4 for 24 h. After co-culture of irradiated BMSCs and M2 macrophages through the Transwell chamber for 48 h, the expression level of α -SMA in BMSCs was significantly reduced, and the effect of the Transwell chamber of the 8 μm group (0.225 ± 0.018) was better than that of the 3 μm group (0.564 ± 0.026), and the difference is statistically significant ($t = 18.71, P < 0.001$). After co-culturing the irradiated BMSCs with M2 type macrophages through the 8 μm Transwell chamber, the positive percentage of Col III (8.2 ± 0.5)% of BMSCs in the 8 μm group was significantly lower than that of the NC group (60.7 ± 1.5)% ($t = 56.47, P < 0.001$), and the positive percentage of reactive oxygen species (9.3 ± 1.7)% in the 8 μm group was also significantly lower than that in the NC group (25.9 ± 1.6)% ($t = 12.4, P = 0.0002$). **Conclusions** M2 macrophages can reduce the production of α -SMA, Col III and ROS in BMSCs after irradiation, and inhibit the transformation of BMSCs into myofibroblasts after radiation, which may have a potential therapeutic effect on the osteoradionecrosis of jaws.

[Key words] Bone marrow cells; Mesenchymal stem cells; Macrophages; Actins; Collagen type III; Reactive oxygen species

Fund program: National Natural Science Foundation of China(81670964)

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2021.04.002

放射治疗是头颈部恶性肿瘤的重要治疗方法之一,并在治疗中起着关键作用^[1]。放射治疗在提高头颈部恶性肿瘤患者临床治愈率的同时会导致各类并发症,其中放射性颌骨骨坏死(osteoradionecrosis of jaws, ORNJ)是最严重且最难治愈的并发症,目前尚缺乏有效的预防和治疗方法^[2]。放射性纤维萎缩学说认为,放射线导致放射部位产生大量的肌成纤维细胞(myofibroblasts, MFB),同时骨基质减少,被纤维组织替代^[3]。有研究证实,在ORNJ动物模型的髓腔、死骨周围MFB分化增多,并可以从ORNJ的组织块中成功分离MFB细胞,进一步说明MFB的分化是ORNJ形成的重要细胞学基础^[4]。

巨噬细胞是机体天然免疫系统的细胞组成部分,具有很高的可塑性,在组织重塑和体内平衡中起着核心作用^[5],微环境的改变会影响巨噬细胞的分化表型,根据功能的不同将其分为两类:经典激活型巨噬细胞(M1型)和替代激活型巨噬细胞(M2型)^[6]。M2型巨噬细胞分泌抗炎细胞因子、转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)、白细胞介素1(IL-1)受体拮抗剂等,具有抑制炎症和促进组织修

复的功能,有助于组织重塑和血管生成^[7]。研究表明,在小肠放射性损伤修复中小鼠肠道内巨噬细胞是以M2型存在的,在小鼠接受放射后其极型不发生改变,在放射性损伤中起到保护作用,肠道内缺乏M2型巨噬细胞会导致肠道损伤修复的延缓^[8]。目前,关于M2型巨噬细胞和ORNJ的相关研究较少,本课题组在前期研究中已建立放射性细胞损伤模型^[9],此次研究拟在前期建立的放射性细胞损伤模型基础上,观察M2型巨噬细胞对放射后骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)向MFB转化的抑制作用,为ORNJ的预防和治疗提供新的思路。

材料与方法

一、实验动物与材料设备

1. 实验动物:雄性SD大鼠由空军军医大学实验动物中心提供,实验动物许可证号为SCXK(陕)2019-001,无特定病原体动物(SPF级),所有大鼠饲养于室温($20 \sim 26$ $^{\circ}\text{C}$),湿度50%~70%的实验室动物房。

2. 实验材料与设备:MEM培养基、磷酸盐缓冲

液(PBS)、DMEM(高糖)、青霉素/链霉素(Hyclone, 美国);胰蛋白酶-EDTA消化液、抗荧光衰减封片剂(北京索莱宝科技有限公司);四季青胎牛血清(fatal bovine serum, FBS;浙江天杭生物科技股份有限公司);4%多聚甲醛固定液(Biosharp, 广州赛国生物科技股份有限公司);红细胞裂解液(西安晶彩生物科技股份有限公司);DAPI溶液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 即用型,西安飞扬生物科技股份有限公司);重组鼠巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)、重组鼠白细胞介素4(IL-4;PEPROTECH, 美国);Ⅲ型胶原(collagen type Ⅲ, Col Ⅲ)抗体(GeneTex, 美国);CD68(Abcam, 英国);CD206(arigo, 上海帛龙生物科技股份有限公司);一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(红色,南京碧云天生物技术有限公司);活性氧测试盒(南京建成生物工程研究所);二氧化碳细胞培养箱(ThermoFisher, 美国);倒置显微镜及拍照系统(Olympus, 日本);激光共聚焦荧光显微镜(Nikon, 日本);细胞无菌操作台(AIRTECH, 美国);高灵敏度化学发光成像系统(Bio-Rad, 美国);台式低速离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司);X射线放射源来源于陕核工业第二一五医院放疗科VARIAN CX5762型放疗机(瓦里安医疗设备中国有限公司)。

二、建立放射性细胞损伤模型

首先获得10日龄雄性SD大鼠BMSC,用含有10% FBS的 α -MEM培养液培养,传代至第三代后接种至有细胞爬片的6孔板内,待细胞密度达底面积的80%后接受2.538 Gy/min剂量率、4 Gy剂量射线放射,以建立放射性细胞损伤模型。在SD大鼠BMSC接受4 Gy剂量射线放射24 h后使用倒置显微镜对正常对照组和4 Gy射线放射组的细胞形态进行观察,48 h后使用4%多聚甲醛溶液固定,TUNEL染色观察细胞凋亡情况。

三、SD大鼠来源的巨噬细胞提取和鉴定

取10日龄的SD大鼠脱颈处死,在超净台内取双侧股骨和胫骨,用10% DMEM(高糖)培养液将骨髓冲至培养皿中,70 μm 细胞滤器将细胞过筛,收集细胞悬液,1000 r/min离心5 min(离心半径19 cm),加入红细胞裂解液常温放置5 min后1000 r/min离心5 min(离心半径19 cm),弃上清接种于培养皿内,培养6~8 h后取上清计数后加入含有M-CSF 30 ng/mL的10% DMEM培养液重悬细胞,以每孔 2×10^6 个细胞将细胞接种于装有细胞爬片的6孔板内,培养第

3 d进行全换液,6~8 d细胞分化为成熟的巨噬细胞(M0)。

巨噬细胞成熟后,PBS冲洗孔板,加入4%多聚甲醛溶液固定20~30 min,0.1% TritonX-100透膜15 min,加入正常山羊血清工作液封闭30 min后不冲洗,实验组加入一抗CD68,对照组则加入PBS,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。复温后用PBS冲洗,加入荧光二抗Goat Anti-Rabbit(IgG Dylight 594),室温避光孵育1 h,PBS冲洗后加入DAPI溶液,室温避光孵育2 min,抗荧光衰减封片剂封片后在荧光显微镜下观察并拍照。

四、大鼠来源的巨噬细胞极化成M2型巨噬细胞并鉴定

向分化成熟巨噬细胞中加入浓度为20 ng/mL的IL-4刺激24 h,巨噬细胞分化为M2型巨噬细胞,PBS冲洗,4%多聚甲醛溶液固定20~30 min后用PBS冲洗,加入0.1% TritonX-100透膜15 min,PBS冲洗2次,山羊血清封闭30 min后不冲洗,实验组加入一抗CD206,对照组加入PBS,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,PBS洗涤2次,加入荧光二抗Goat Anti-Rabbit(IgG Dylight 488),室温下避光孵育1 h,滴加少量DAPI染色液避光孵育2 min,PBS洗涤2~3次,滴加少量抗荧光衰减剂后封片后在荧光显微镜下观察。

五、SD大鼠来源的M2型巨噬细胞与放射后的大鼠骨髓间充质干细胞共培养

BMSC在接受4 Gy射线放射后培养过夜,在六孔板内放入专用Transwell小室,设置3个分组:(1)实验组1(3 μm 组),为放置孔径3 μm 的小室,上室内加入M2型巨噬细胞;(2)实验组2(8 μm 组),为孔径8 μm 的小室,上室内加入M2型巨噬细胞,实验组上室内巨噬细胞与下室内BMSC的比例大约为1:1;(3)对照组(NC组),为放射后的大鼠BMSC。

六、实验检测指标

SD大鼠来源的M2型巨噬细胞与4 Gy放射后的SD大鼠BMSC共培养48 h后提取蛋白用于Western blot检测,检测的指标为MFB的特异性分子标志 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)。根据Western blot检测结果选择效果相对明显的共培养体系,使用此共培养体系作为实验组将SD大鼠来源的M2型巨噬细胞与4 Gy射线放射后的SD大鼠BMSC共培养,对照组(NC组)为4 Gy射线放射后的大鼠BMSC,共培养48 h后取出六孔板下室内爬片用于免疫荧光检测,用4%多聚甲醛溶液固定爬

片, PBS 冲洗后使用 0.1% TritonX-100 透膜 15 min, PBS 冲洗 2 次, 山羊血清封闭 30 min 后不冲洗, 分别加入一抗, 4 ℃ 孵育过夜, PBS 洗涤 2 次, 加入荧光二抗室温下避光孵育 1 h, 滴加少量 DAPI 染色液避光孵育 2 min, PBS 洗涤 2 ~ 3 次, 滴加少量抗荧光衰减剂后封片在荧光显微镜下观察, 检测指标为 Col III 和活性氧(reactive oxygen species, ROS)。

七、统计学处理方法

使用 SPSS 22.0 进行统计学分析。所有实验重复进行, 大多数实验重复 3 次, 通过标准实验步骤获得的数据以 $Mean \pm SD$ 表示, 若数据符合正态分布则采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。在激光共聚焦实验中, 对照组和实验组均采用独立样本 t 检验比较。在 Western blot 实验中, 对照组与两组实验组两两比较, 进行 One-Way ANOVA, 验证组间差异有统计学意义。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

一、细胞放射损伤模型镜下观察和 TUNEL 染色结果

SD 大鼠来源的第三代 BMSC 在接受 4 Gy 射线放射 24 h 后倒置显微镜下观察, 观察可见接受放射后的细胞培养液上清中有少量悬浮的凋亡细胞, 细胞密度降低, 细胞形态明显缩小(图 1)。TUNEL 染色结果显示, 4 Gy 射线放射组 48 h 时细胞数目减少

且凋亡明显增多(图 2)。

二、SD 大鼠来源的巨噬细胞提取和鉴定结果

巨噬细胞原代接种后第 6 ~ 8 d 细胞成熟, 在倒置显微镜下观察细胞大部分贴壁, 细胞形态多样, 有伪足和凸起(图 3)。巨噬细胞成熟后, 利用免疫荧光检测细胞 CD68 的表达(图 4)。

三、M2 型巨噬细胞的诱导与鉴定

在成熟的巨噬细胞培养液内加入浓度为 20 ng/mL 的 IL-4, 24 h 后获得 M2 型巨噬细胞, 利用免疫荧光鉴定其特异性表达蛋白 CD206 的表达, 结果显示加入 IL-4 后的巨噬细胞中 CD206 阳性表达百分比 $[(42.8 \pm 4.0)\%]$ 明显高于阴性对照组阳性表达百分比 $[(2.7 \pm 1.2)\%]$, 差异有统计学意义 ($t = 16.53, P < 0.001$, 图 5)

四、M2 型巨噬细胞与放射后的大鼠骨髓间充质干细胞共培养

将 M2 型巨噬细胞经不同共培养体系与接受 4 Gy 剂量射线放射的 SD 大鼠 BMSC 进行共培养, 共培养 48 h 后取掉 Transwell 小室, 在倒置相差显微镜下观察细胞形态。镜下观察可见经不同共培养体系共培养后的细胞增殖能力无明显差异, NC 组细胞呈成纤维细胞样生长, 细胞之间的连接增多, 细胞上清中出现漂浮凋亡细胞; 3 μm 组镜下可见共培养后的下室细胞上清中有少量巨噬细胞; 8 μm 组镜下可见共培养后的下室细胞上清中出现大量的巨噬细胞, 表明 M2 型巨噬细胞可以穿过滤膜直接作用于下室细胞, 共

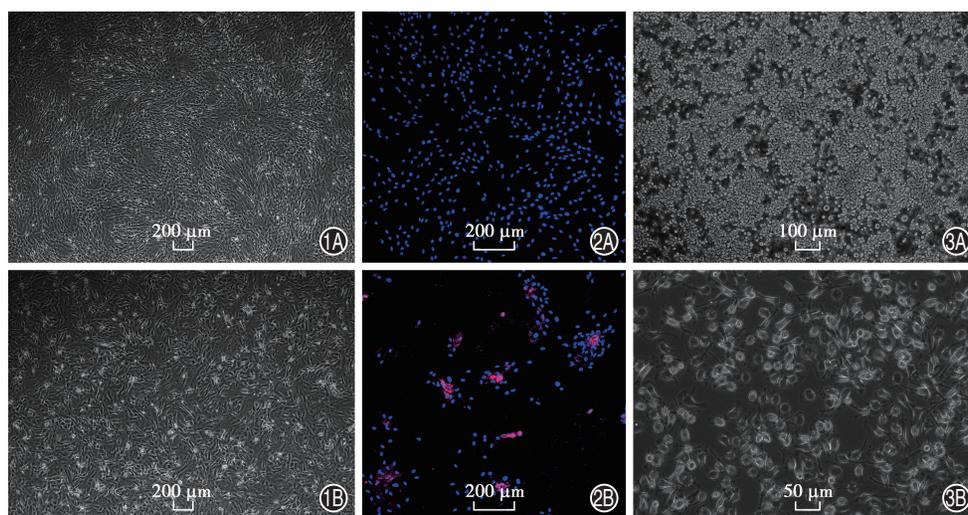


图 1 第三代 SD 大鼠骨髓间充质干细胞(BMSC)倒置显微镜下观察 1A: 正常细胞为长梭形, 呈漩涡状生长; 1B: 4 Gy 射线放射后 24 h 的细胞密度降低, 细胞形态明显缩小 图 2 第三代 SD 大鼠骨髓间充质干细胞(BMSC)荧光显微镜下观察(TUNEL 染色) 2A: 正常细胞核形态完整且细胞数量均匀, 细胞凋亡极少; 2B: 4 Gy 射线放射后 48 h 的细胞数量减少, 出现细胞凋亡 图 3 SD 大鼠成熟的巨噬细胞倒置显微镜下观察 3A: 可见成熟后的巨噬细胞大部分呈贴壁状态; 3B: 图 3A 的 2 倍放大, 可见成熟的巨噬细胞形态多样, 大部分细胞有伪足

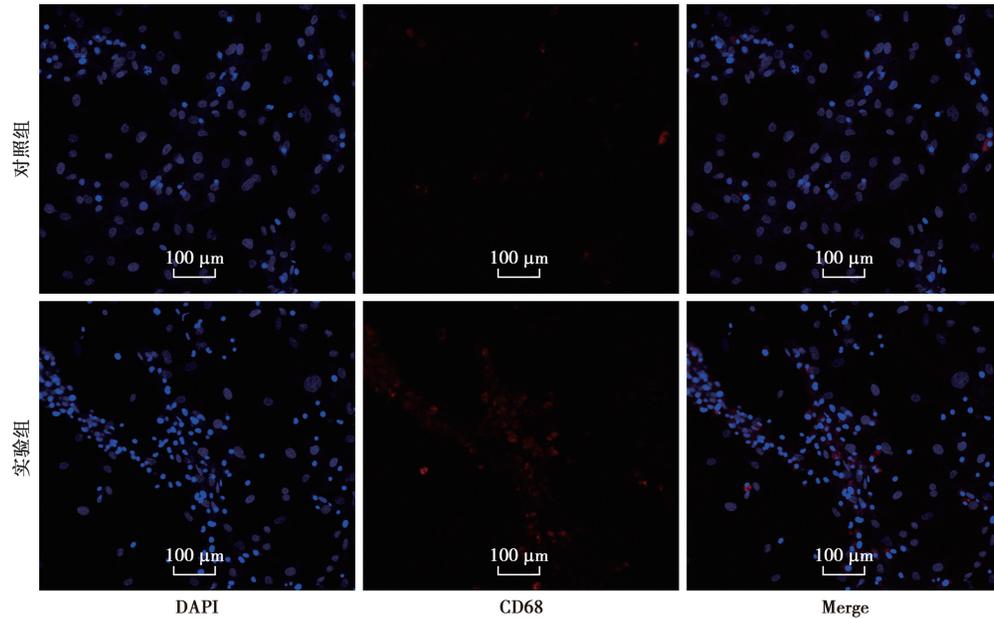


图4 SD大鼠成熟的巨噬细胞荧光显微镜鉴定 对照组有极个别细胞或者杂质呈现阳性表达;实验组 CD68 表达的阳性细胞着色为(Dylight 594)红色

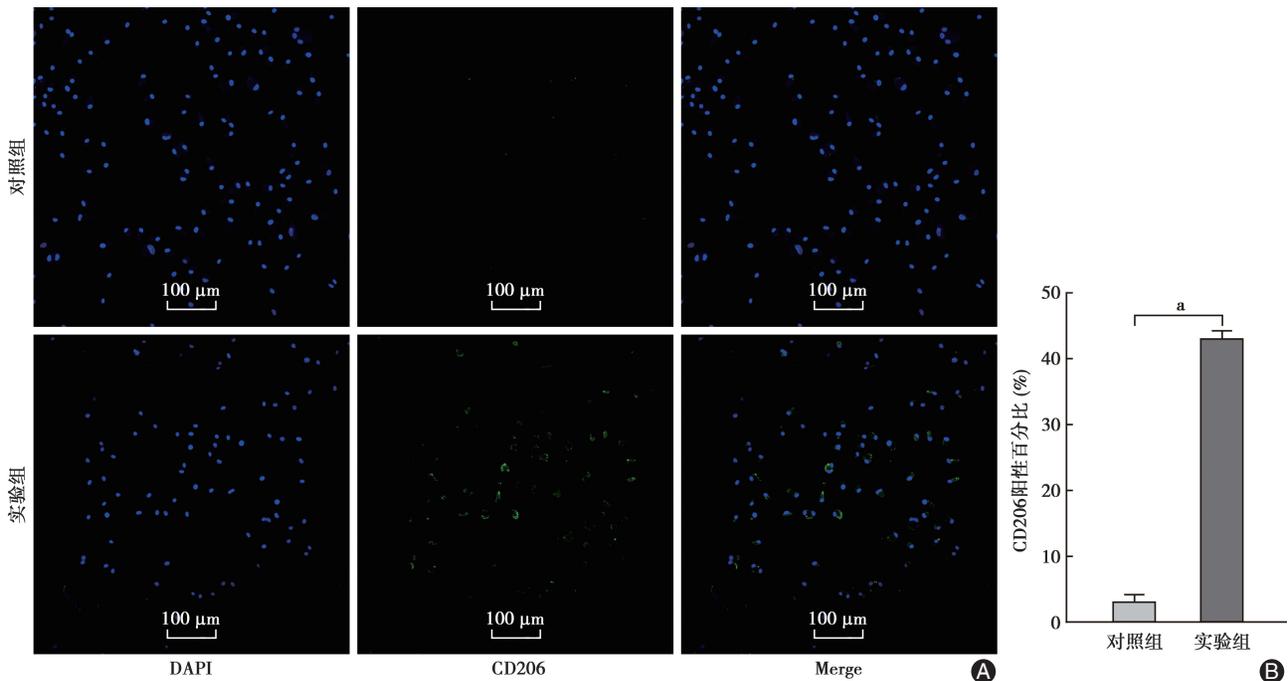


图5 M2型巨噬细胞诱导与鉴定 A:免疫荧光鉴定,对照组有个别杂质呈阳性表达,实验组 M2型巨噬细胞特异性蛋白分子 CD206 的阳性表达率较高;B:CD206免疫荧光染色(Dylight 488绿色)结果统计学分析,实验组与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.001$)

培养后的细胞形态呈较均匀的细长形(图6)。

五、Western blot 检测结果

通过 Western blot 技术检测,通过不同共培养体系将 4 Gy 射线放射后的 SD 大鼠 BMSC 与 SD 大鼠 M2 型巨噬细胞共培养,共培养后接受 4 Gy 射线放射的 BMSC 中 α -SMA 表达量比 NC 组 (1 ± 0.018) 明显降低,且 8 μ m 组的 Transwell 小室的效果 ($0.225 \pm$

0.018) 要优于 3 μ m 组的效果 (0.564 ± 0.026), 各組间差异均有统计学意义 ($P < 0.001$, 图7)。

六、免疫荧光检测结果

1. Col III: 根据 Western blot 实验结果选择使用 8 μ m Transwell 小室将 4 Gy 射线放射后的 SD 大鼠 BMSC 与 SD 大鼠 M2 型巨噬细胞共培养 48 h 后进行 Col III 免疫荧光检测,结果表明 8 μ m 组中共培养后

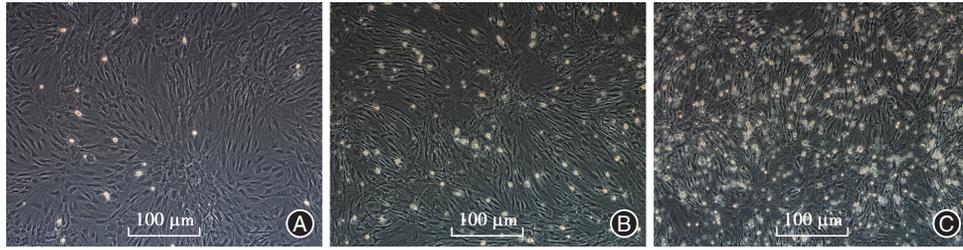


图6 M2型巨噬细胞与4 Gy射线放射后的SD大鼠骨髓间充质干细胞(BMSC)共培养48 h后倒置显微镜下观察 A:NC组;B:3 μm组;C:8 μm组

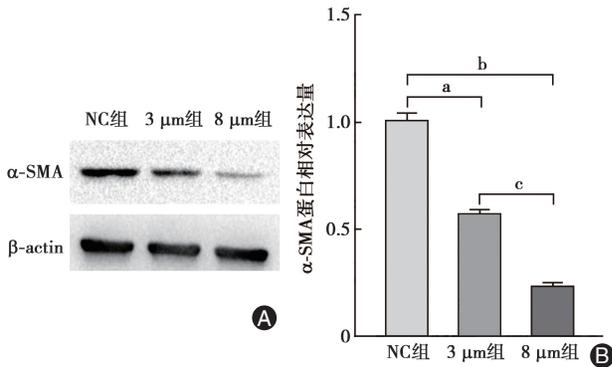


图7 4 Gy射线放射后的SD大鼠骨髓间充质干细胞(BMSC)与M2型巨噬细胞共培养48 h后细胞内α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)的表达 A:Western blot检测结果;B:结果统计学分析图,可见3 μm组与NC组比较,α-SMA表达量明显减少($t=24.06, ^*P<0.001$),8 μm组与NC组比较,α-SMA表达量显著降低($t=52.28, ^bP<0.001$),8 μm组与3 μm组比较,差异明显($t=18.71, ^*P<0.001$)

4 Gy射线放射的BMSC中Col III阳性百分比[(8.2 ± 0.5)%]明显低于NC组[(60.7 ± 1.5)%],差异具有统计学意义($t=56.47, P<0.001$,图8)。

2. ROS:使用8 μm Transwell小室将4 Gy射线放射后的SD大鼠BMSC与SD大鼠M2型巨噬细胞共培养48 h后检测细胞内ROS的表达,结果表明8 μm组中ROS的阳性百分比[(9.3 ± 1.7)%]较NC组的ROS阳性百分比[(25.9 ± 1.6)%]显著降低,差异具有统计学意义($t=12.4, P=0.0002$,图9)。

讨论

ORNJ是头颈部肿瘤放射治疗的严重并发症^[10],下颌骨因其特殊的解剖位置和特点成为颌面部最易发生放射性骨髓炎的部位^[11]。近几年众多学者

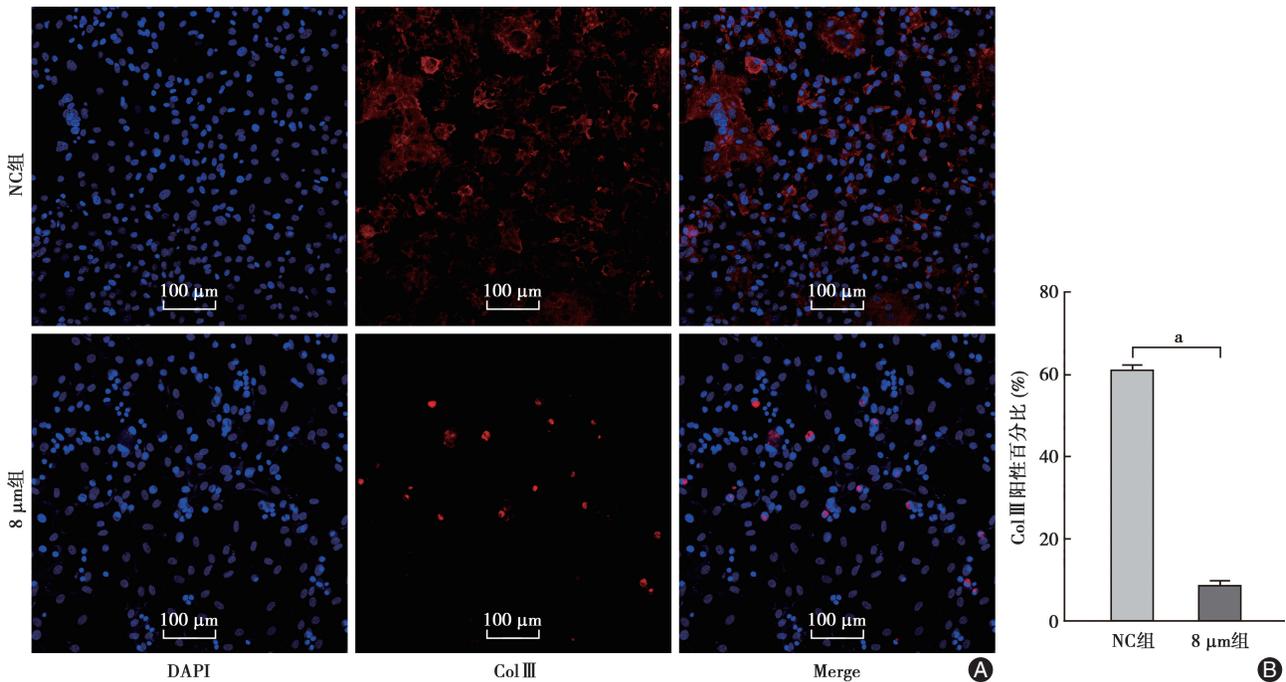


图8 4 Gy射线放射后的SD大鼠骨髓间充质干细胞(BMSC)与M2型巨噬细胞共培养48 h后细胞内Ⅲ型胶原(Col III)的表达水平 A:Col III免疫荧光染色结果图,NC组为第三代SD大鼠BMSC接受4 Gy射线放射组,8 μm组为4 Gy射线放射后的SD大鼠BMSC与M2型巨噬细胞通过8 μm Transwell小室共培养组,DAPI为细胞核染色,Col III特异性染色(Dylight 594)红色,Merge为DAPI和Col III染色合并图;B:Col III免疫荧光染色结果统计学分析图,8 μm组与NC组比较,差异具有统计学意义($^*P<0.001$)

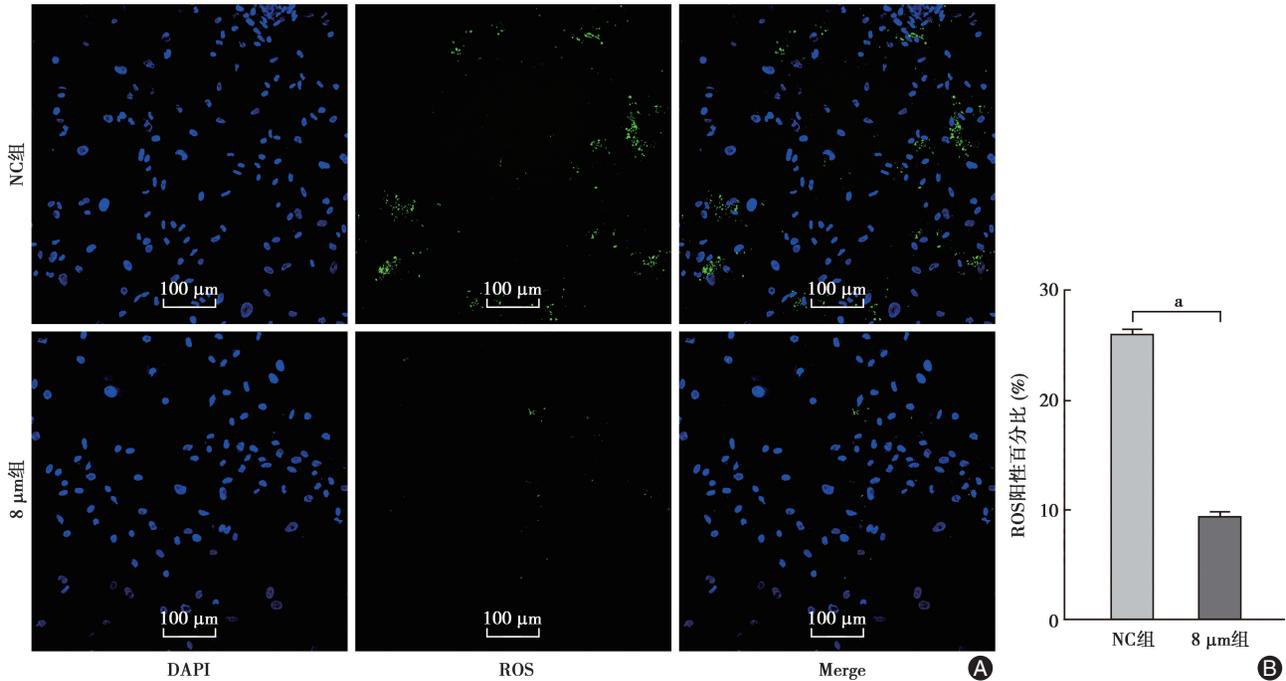


图9 4 Gy射线放射后的SD大鼠骨髓间充质干细胞(BMSC)与M2型巨噬细胞共培养48 h后细胞内活性氧(ROS)的表达水平 A:ROS免疫荧光染色结果图,NC组为第三代SD大鼠BMSC接受4 Gy射线放射组,8 μm组为4 Gy射线放射后的SD大鼠BMSC与M2型巨噬细胞通过8 μm Transwell小室共培养组,DAPI为细胞核染色,ROS特异性染色为绿色,Merge为DAPI和ROS染色合并图;B:ROS免疫荧光染色统计学分析图,8 μm组与NC组比较,差异有统计学意义(* $P=0.0002$)

提出,ORNJ是一种由于射线引起的纤维萎缩性疾病^[3,12],临床上应用抗纤维化药物己酮可可碱和维生素E联合治疗可预防ORNJ并可逆转其病程,其治疗ORNJ的疗效优于其他治疗方法^[13]。

为对ORNJ发病过程中的细胞变化进行研究,本课题组在前期研究中建立了放射性细胞损伤模型^[9]。根据放射性纤维萎缩学说和相关实验研究,BMSC是ORNJ中MFB的来源之一,BMSC也骨骼中存在最多的细胞,具有多向分化的潜能^[4],所以选取SD大鼠来源的BMSC作为建立放射性细胞损伤模型的细胞。将SD大鼠来源的BMSC经不同剂量(2、4、6、8 Gy)放射后观察细胞形态、增殖和凋亡,细胞的增殖能力与接受放射的剂量呈负相关,即剂量越大细胞的增殖能力越低,而细胞受损的程度与剂量呈正相关。2 Gy射线剂量对细胞的增殖能力影响较小,与对照组相比无明显差异,6、8 Gy剂量放射后细胞出现明显的辐照毒性且细胞大量死亡,无法进行后续实验研究,而4 Gy剂量放射后细胞的增殖能力明显下降,辐照效应较明显,且细胞存在增殖能力,遂选取接受4 Gy剂量放射后的BMSC作为放射性细胞损伤模型进行后续相关实验研究。

巨噬细胞是机体先天免疫系统的基本组成部分,具有较高的可塑性,在不同的微环境的刺激下

可发生细胞极化,在宿主防御感染的过程中起关键作用^[14]。M1型巨噬细胞具有促炎性特点,M2型巨噬细胞可抑制炎症反应并与伤口修复相关^[15]。M2型巨噬细胞作为巨噬细胞中一类极化的细胞,参与并调节多种疾病的发生^[16-17]。小肠放射性损伤研究表明小鼠肠道内的巨噬细胞以M2型存在,在小鼠接受放射后巨噬细胞的极型不发生改变,在放射性损伤中起到保护作用,M2型巨噬细胞通过分泌EGF因子促进肠道隐窝干细胞Lgr5生长繁殖,肠道内缺乏M2型巨噬细胞会导致肠道损伤修复的延缓^[8]。在骨质疏松和巨噬细胞的相关研究中,M2型巨噬细胞分泌抗炎因子IL-10可下调促炎因子的表达水平,抑制免疫炎症反应,降低巨噬细胞中活化T细胞核因子(nuclear factor-activated T cell 1, NFATc1)的表达,进而抑制破骨细胞(osteoclast, OC)的形成。体外培养大鼠绝经后骨质疏松症的骨髓巨噬细胞(bone marrow-derived macrophage, BMM)后发现骨质疏松状态下的BMM更倾向于向M1型巨噬细胞方向极化,而M2型巨噬细胞的表面标志物和抗炎因子的表达均有所降低^[18]。M2型巨噬细胞在心肌梗死恢复期作用的研究中表明M2型巨噬细胞对心肌梗死后心功能的恢复体现在抑制炎症反应,促进血管生成和胶原蛋白形成,且巨噬细胞极化状态的调

节是心肌修复的关键^[19]。M2型巨噬细胞在脓毒症心功能不全的病理生理过程发挥重要作用,可拮抗炎症反应,保护微血管内皮细胞,促进心肌血管生成并保护心肌细胞^[20]。

目前,关于M2型巨噬细胞与ORNJ的相关研究甚少,本实验在前期建立的放射性细胞损伤模型基础上研究M2型巨噬细胞对放射后BMSC向MFB转化的影响。此次实验分为3组:对照组为接受4 Gy剂量辐照的BMSC,不进行共培养;实验组1为加入孔径为3 μm 的Transwell小室,小室内加入M2型巨噬细胞与下室细胞共培养;实验组2使用8 μm Transwell小室,下室为接受4 Gy剂量辐照的BMSC,上室为M2型巨噬细胞,共培养时两种细胞的比例约为1:1,观察同等数量不同细胞之间的相互作用,共培养48 h后取小室,镜下观察可见使用8 μm 小室共培养后下室细胞上清中有大量巨噬细胞,表明M2型巨噬细胞可以穿过滤膜直接作用于下室细胞,而3 μm 小室组由于孔径较小下室细胞上清中只有少量的巨噬细胞。Western blot结果显示,接受放射的BMSC与M2型巨噬细胞共培养后细胞内 α -SMA、Col III和ROS的表达量明显较少,且8 μm 小室共培养的效果优于3 μm 小室,可以认为M2型巨噬细胞与接受放射后的BMSC接触式共培养后可显著改善细胞受损程度,可减少放射后的BMSC向MFB的分化进而减少放射细胞的纤维化。本研究认为,M2型巨噬细胞与放射后的BMSC直接接触可促进M2型巨噬细胞产生抗炎因子,激活细胞再生修复潜能,从而减少纤维化的产生,但其具体作用机制还需后续试验进一步证实。

本实验结果表明,通过体外共培养实验,用同源的M2型巨噬细胞与放射后的BMSC共培养后发现放射后的细胞 α -SMA、Col III和ROS的含量明显下降。 α -SMA为MFB的特异性分子标志,是一种肌动蛋白存在于张力纤维之中,Col III是纤维化的重要检测指标,氧化应激反应是形成ORNJ的重要原因之一,氧化应激反应则产生ROS。本次利用上述3个检测指标说明了M2型巨噬细胞可以抑制放射后的BMSC向MFB分化,并减少ROS的生成,说明M2型巨噬细胞对BMSC的放射性损伤有一定改善作用,其可能的原因是M2型巨噬细胞通过降低ROS水平,减轻氧化应激反应从而减少放射细胞的纤维化。

本实验首次探索M2型巨噬细胞对放射损伤后

BMSC的作用,从细胞水平表明M2型巨噬细胞可减少放射损伤BMSC中 α -SMA、Col III和ROS的表达量,可为以后研究以巨噬细胞介导的免疫微环境为靶点的ORNJ防治提供一个新的思路和策略,但其具体作用机制需要进一步实验研究,还需要通过体内实验从动物水平验证本次实验效果。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Alterio D, Marvaso G, Ferrari A, et al. Modern radiotherapy for head and neck cancer[J]. *Semin Oncol*, 2019, 46(3): 233-245. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2019.07.002.
- [2] Chronopoulos A, Zarra T, Ehrenfeld M, et al. Osteoradionecrosis of the jaws: definition, epidemiology, staging and clinical and radiological findings. A concise review[J]. *Int Dent J*, 2018, 68(1): 22-30. DOI: 10.1111/ijdj.12318.
- [3] Delanian S, Lefaix JL. The radiation - induced fibroatrophic process: therapeutic perspective via the antioxidant pathway[J]. *Radiother Oncol*, 2004, 73(2): 119-131. DOI: 10.1016/j.radonc.2004.08.021.
- [4] 郭宇轩. 肌成纤维细胞在放射性颌骨坏死发生机制中作用的初步实验研究[D]. 西安:第四军医大学, 2016. DOI: CNKI: CDMD: 2.1016.778343.
- [5] Shapouri - Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 6425 - 6440. DOI: 10.1002/jcp.26429.
- [6] Murray PJ. Macrophage Polarization[J]. *Annu Rev Physiol*, 2017, 79: 541 - 566. DOI: 10.1146/annurev - physiol - 022516 - 034339.
- [7] 周琦, 孙慧娟, 于栋华, 等. 巨噬细胞M1/M2型极化在不同疾病中的作用机制[J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(11): 1502 - 1506. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2020.11.005.
- [8] 齐丹丹. M2型巨噬细胞在小肠放射损伤修复中的作用和机制研究[D]. 苏州:苏州大学, 2015. DOI: 10.7666/d.D656052.
- [9] 赵路, 贾骏麟, 田磊, 等. 基于钴60的大鼠BMSCs细胞实验模型的建立[J]. *实用口腔医学杂志*, 2020, 36(3): 433-436. DOI: 10.3969/j.issn.1001-3733.2020.03.005.
- [10] 何悦. 放射性颌骨坏死诊治的昨天、今天和明天[J]. *中华口腔医学杂志*, 2021, 56(5): 410-414. DOI: 10.3760/cma.j.cn112144-20210122-00035.
- [11] Reuther T, Schuster T, Mende U, et al. Osteoradionecrosis of the jaws as a side effect of radiotherapy of head and neck tumour patients—a report of a thirty year retrospective review[J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2003, 32(3): 289-295. DOI: 10.1054/ijom.2002.0332.
- [12] 韩煜, 何悦. 放射性颌骨坏死的病因学研究进展[J]. *口腔医学*, 2020, 40(4): 362-365. DOI: 10.13591/j.cnki.kqyx.2020.04.015.
- [13] Zhang Z, Xiao W, Jia J, et al. The effect of combined

- application of pentoxifylline and vitamin E for the treatment of osteoradionecrosis of the jaws: a meta-analysis [J]. 2020, 129(3):207-214. DOI:10.1016/j.oooo.2019.08.005.
- [14] 白林,辛月娇,段丁瑜,等.巨噬细胞功能和炎症消退机制及与牙周炎关系研究进展[J].华西口腔医学杂志,2017,35(4):427-432. DOI:10.7518/hxkq.2017.04.016.
- [15] 吴秀华,郑文洁.巨噬细胞极化[J].中华临床免疫和变态反应杂志,2017,11(2):161-165. DOI:10.3969/j.issn.1673-8705.2017.02.011.
- [16] 郑新,王红艳.M2型巨噬细胞极化及相关疾病的研究进展[J].生命科学,2017,29(9):883-890. DOI:10.13376/j.cbbs/20171118.
- [17] 侯昱扬,闫东梅.M2型巨噬细胞来源的外泌体中miRNA对疾病的影响及其机制研究进展[J].国际免疫学杂志,2020,43(3):325-330. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4394.2020.03.016.
- [18] 周玲,许雄程,王松,等.骨质疏松大鼠骨髓巨噬细胞的体外培养研究[J].中国骨质疏松杂志,2019,25(4):439-445. DOI:10.3969/j.issn.1006-7108.2019.04.004.
- [19] 黄娟娟,杨颖溪,张军平.M2型巨噬细胞在心肌梗死恢复期作用的研究进展[J].细胞与分子免疫学杂志,2020,36(7):657-663. DOI:10.13423/j.cnki.cjemi.009041.
- [20] 康文,王龙,王晞.M2型巨噬细胞在脓毒症心功能不全中的功能与调控[J].医学综述,2018,24(17):3329-3333. DOI:10.3969/j.issn.1006-2084.2018.17.001.

(收稿日期:2021-04-16)

(本文编辑:王嫚)